

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | | |
|---|--|----|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, 15/10, 7/00, 7/01 | | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 96/17070 |
| | | | (43) Date de publication internationale: 6 juin 1996 (06.06.96) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01590 | | | (81) Etats désignés: AU, CA, JP, SG, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). |
| (22) Date de dépôt international: 1er décembre 1995 (01.12.95) | | | |
| (30) Données relatives à la priorité: 94/14470 1er décembre 1994 (01.12.94) FR | | | |
| (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). | | | |
| (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHARTIER, Cécile [FR/FR]; 14, rue du Dôme, F-67000 Strasbourg (FR). DEGRYSE, Eric [FR/FR]; 18, rue du Maréchal-Lefebvre, F-67100 Strasbourg (FR). | | | |
| (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). | | | |

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.*

(54) Title: METHOD OF PREPARING A VIRAL VECTOR BY HOMOLOGOUS INTERMOLECULAR RECOMBINATION

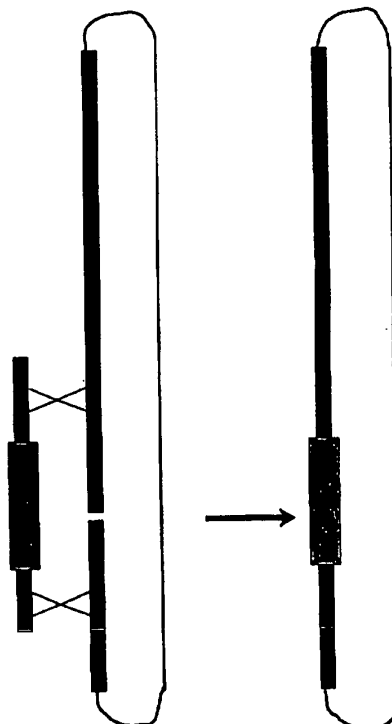
(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION D'UN VECTEUR VIRAL PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE INTERMOLECULAIRE

(57) Abstract

Method of preparing within a procaryotic cell a recombinant viral vector by intermolecular homologous recombination, method of preparing an infectious viral particle containing such a vector and pharmaceutical composition comprising said vector or particle. The invention also concerns the therapeutic use of said vector or particle, especially in human gene therapy.

(57) Abrégé

L'invention concerne un procédé pour préparer dans une cellule procaryote un vecteur viral recombinant par recombinaison homologue intermoléculaire, un procédé pour préparer une particule virale infectieuse contenant un tel vecteur, ainsi qu'une composition pharmaceutique les comprenant. L'invention couvre également leur usage thérapeutique, notamment dans le cadre de la thérapie génique appliquée à l'homme.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche | GB | Royaume-Uni | MR | Mauritanie |
| AU | Australie | GE | Géorgie | MW | Malawi |
| BB | Barbade | GN | Guinée | NE | Niger |
| BE | Belgique | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BF | Burkina Faso | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BG | Bulgarie | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BJ | Bénin | IT | Italie | PL | Pologne |
| BR | Brésil | JP | Japon | PT | Portugal |
| BY | Bélarus | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| CA | Canada | KG | Kirghizistan | RU | Fédération de Russie |
| CF | République centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CG | Congo | | | SE | Suède |
| CH | Suisse | KR | République de Corée | SI | Slovénie |
| CI | Côte d'Ivoire | KZ | Kazakhstan | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroun | LI | Liechtenstein | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LK | Sri Lanka | TD | Tchad |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TG | Togo |
| CZ | République tchèque | LV | Lettonie | TJ | Tadjikistan |
| DE | Allemagne | MC | Monaco | TT | Trinité-et-Tobago |
| DK | Danemark | MD | République de Moldova | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | MG | Madagascar | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FI | Finlande | ML | Mali | UZ | Ouzbékistan |
| FR | France | MN | Mongolie | VN | Viet Nam |
| GA | Gabon | | | | |

Procédé de préparation d'un vecteur viral par recombinaison homologue intermoléculaire

La présente invention concerne une méthode pour préparer un vecteur viral *in vitro*
5 dans une cellule procaryote et son application pour produire une particule virale infectieuse destinée à un usage thérapeutique et, en particulier, un usage en thérapie génique.

La possibilité de traiter les maladies humaines par thérapie génique est passée en
10 quelques années du stade des considérations théoriques à celui des applications cliniques. Le premier protocole appliqué à l'homme a été initié aux Etats Unis en septembre 1990 sur un patient génétiquement immunodéficient en raison d'une mutation affectant le gène codant pour l'Adénine Désaminase (ADA). Le succès relatif de cette première expérimentation a encouragé le développement de nouveaux
15 protocoles de thérapie génique pour diverses maladies génétiques ou acquises (maladies infectieuses et notamment virales comme le SIDA ou cancers). La grande majorité des protocoles décrits jusqu'à présent met en oeuvre des vecteurs viraux pour transférer et exprimer le gène thérapeutique dans les cellules à traiter.

20 A ce jour, les vecteurs rétroviraux sont parmi les plus utilisés du fait de la simplicité de leur génome. Cependant, outre leur capacité restreinte de clonage, ils présentent deux inconvénients majeurs qui limitent leur utilisation systématique : d'une part, ils infectent majoritairement les cellules en division et d'autre part, du fait de leur intégration au hasard dans le génome de la cellule hôte, le risque de mutagenèse
25 insertionnelle n'est pas négligeable. C'est pourquoi, de nombreuses équipes scientifiques se sont attachées à développer d'autres types de vecteurs, parmi lesquels on peut citer ceux issus des adénovirus, virus associés aux adénovirus (AAV), poxvirus et virus de l'herpès. D'une manière générale, leur organisation et leur cycle d'infection sont largement décrits dans la littérature accessible à l'homme de l'art.

30

A cet égard, l'emploi des vecteurs adénoviraux est apparu comme une alternative

prometteuse. Les adénovirus ont été mis en évidence dans de nombreuses espèces animales, ont un large spectre d'hôte, sont peu pathogènes et ne présentent pas les inconvénients liés aux rétrovirus puisqu'ils se répliquent dans les cellules quiescentes et sont non-intégratifs. A titre indicatif, leur génome est constitué d'une molécule
5 d'ADN linéaire et bicaténaire d'environ 36 kb portant plus d'une trentaine de gènes, à la fois des gènes précoces nécessaires à la réplication virale (E1 à E4) et des gènes tardifs de structure (L1 à L5) (voir Figure 1).

D'une manière générale, les vecteurs adénoviraux sont obtenus par délétion d'au moins
10 une partie des gènes viraux (notamment de la région E1 essentielle à la réplication virale) qui sont remplacés par les gènes thérapeutiques. En conséquence, ils sont propagés dans une lignée cellulaire, dite de complémentation, qui fournit *en trans* les fonctions virales délétées pour générer une particule de vecteur viral défective pour la réplication mais capable d'infecter une cellule hôte. On utilise couramment la lignée
15 293, établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain, qui complémente les adénovirus défectifs pour la fonction E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36, 59-72).

Les techniques de préparation des vecteurs adénoviraux sont largement décrites dans
20 la littérature (voir notamment Graham et Prevec, Methods in Molecular Biology, Vol 7 ; Gene Transfer and Expression Protocols ; Ed : E.J. Murray, 1991, The Human Press Inc., Clinton, NJ). Une des méthodes les plus employées consiste à générer le vecteur adénoviral recombinant dans les cellules de complémentation transfectées avec un plasmide bactérien portant le gène d'intérêt sous-cloné au sein de sa région
25 d'insertion adénovirale et le génome adénoviral. Généralement, ce dernier est clivé par une enzyme de restriction appropriée afin de réduire l'infectivité de l'ADN viral parental et augmenter l'efficacité d'isolement des adénovirus recombinants. Cependant, on observe néanmoins un bruit de fond important de particules virales infectieuses d'origine parentale, ce qui nécessite un travail d'analyse des plages obtenues
30 particulièrement lourd (d'un point de vue temps et coût puisque chaque plage doit être amplifiée et analysée individuellement). Ceci est problématique lorsque le virus

parental présente un avantage sélectif sur l'adénovirus recombinant, par exemple lorsque ce dernier se réplique plus lentement que le virus parental, du fait de l'insertion d'un gène d'intérêt de grande taille (Facteur VIII, dystrophine), réduisant d'autant sa probabilité d'obtention.

5

La ligation entre deux fragments d'ADN générés par les techniques classiques de biologie moléculaire et portant respectivement les parties 5' et 3' du vecteur adénoviral recombinant peut également être employée. La transfection du mélange de ligation dans les cellules de complémentation permet en théorie d'encapsider le génome de l'adénovirus recombinant pour former une particule infectieuse. Cette technologie est peu efficace et son application limitée par le nombre restreint de sites de restriction appropriés et uniques.

On a maintenant montré qu'il est possible de générer dans *Escherichia coli* (*E. coli*) un vecteur adénoviral recombinant par recombinaison homologue intermoléculaire entre un plasmide contenant le génome d'un adénovirus de type 5 et un insert portant une séquence d'ADN exogène entourée de séquences adénovirales A et B (Figure 2). Ce procédé conduit au remplacement dans le génome adénoviral de la région ciblée située entre A et B par la séquence exogène. La transfection du vecteur adénoviral recombinant ainsi généré dans une lignée de complémentation adéquate donne lieu à une particule virale infectieuse qui peut être utilisée sans étape préalable de purification pour infecter une cellule hôte. Le bruit de fond (contamination par des particules virales parentales) est réduit voire même supprimé. En outre, on a trouvé de manière surprenante que l'usage de souches d'*E. coli* recBC sbcBC est particulièrement avantageux pour favoriser la recombinaison intermoléculaire entre deux fragments quelconques d'ADN.

Le procédé de la présente invention repose sur l'exploitation des activités enzymatiques endogènes des cellules procaryotes impliquées dans la recombinaison homologue. cette technique de recombinaison intermoléculaire avait déjà été décrite pour le clonage de petits inserts dans les vecteurs bactériens (Bubeck et al., 1993,

30

Nucleic Acids Research, 21, 3601-3602) ou pour générer par recombinaison intramoléculaire des gènes hybrides (Calogero et al., 1992, FEMS Microbiology Letters, 97, 41-44 ; Caramori et al., 1991, Gene, 98, 37-44). Cependant, cette technologie de recombinaison n'avait jamais été mise en oeuvre dans des cellules
5 procaryotes pour générer des vecteurs viraux infectieux (capables d'être encapsidés en particules virales infectieuses).

Le procédé de l'invention présente l'avantage sur les techniques antérieures d'être rapide, particulièrement efficace et de ne requérir que peu de manipulations *in vitro*.
10 De plus, il peut être mis en oeuvre avec des fragments d'ADN générés par PCR (Polymerase Chain Reaction) évitant ainsi les étapes de sous-clonage de la séquence d'ADN exogène dans la région d'insertion du génome viral. Enfin, il apporte une solution avantageuse au problème de bruit de fond clairement identifié dans la littérature. Par conséquent, il s'avère particulièrement performant pour les vecteurs
15 issus de virus de grande taille ou dans lesquels on envisage d'insérer une séquence d'ADN exogène de grande taille.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un procédé pour préparer dans une cellule procaryote un vecteur viral recombinant dérivé d'un virus parental dans le
20 génome duquel est insérée une séquence d'ADN exogène, par recombinaison intermoléculaire entre (i) un premier fragment d'ADN comprenant tout ou partie dudit génome du virus parental et (ii) un second fragment d'ADN comprenant ladite séquence d'ADN exogène entourée de séquences flanquantes A et B homologues à (i).

25

Au sens de la présente invention, un vecteur viral recombinant est obtenu à partir d'un virus parental modifié de manière à porter en un site approprié du génome viral et exprimer une séquence d'ADN exogène. Les virus parentaux susceptibles d'être utilisés dans le cadre de l'invention sont, par exemple, les alphavirus, les rétrovirus, les
30 poxvirus et notamment le virus de la vaccine ou le canarypox, les virus de l'herpès, les virus associés aux adénovirus (AAV) et tout particulièrement les adénovirus.

A cet égard, le choix de l'adénovirus parental est très large. Il peut s'agir d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore d'un adénovirus hybride comprenant des fragments de génome adénoviral de différentes origines. On préférera tout particulièrement un adénovirus d'origine humaine de sérotype C et de préférence un adénovirus de type 2 ou 5 ou encore un adénovirus d'origine animale de type CAV-1 ou CAV-2 (canine), DAV (aviaire) ou encore BAd (bovine). Ces virus et leur génome sont décrits dans la littérature (voir par exemple Zakharchuk et al., 1993, Arch. Virol., 128, 171-176 ; Spibey et Cavanagh, 1989, J. Gen. Virol., 70, 165-172 ; Jovenne et al., 1987, Gene, 10 60, 21-28 ; Mittal et al., 1995, J. Gen. Virol., 76, 93-102).

Un procédé selon l'invention a pour objet la préparation d'un vecteur viral recombinant pour le transfert et l'expression d'une séquence d'ADN exogène dans une cellule hôte. Par "séquence d'ADN exogène", on entend un acide nucléique qui comprend des 15 séquences codantes et des séquences régulatrices permettant l'expression desdites séquences codantes et dans lequel les séquences codantes sont des séquences qui ne sont normalement pas présentes dans le génome d'un virus parental en usage dans la présente invention ou si elles le sont dans un contexte génomique différent. Dans le cadre de l'invention, la séquence d'ADN exogène peut-être constituée d'un ou 20 plusieurs gènes. Les séquences régulatrices peuvent être d'origines quelconques.

D'une manière préférée, la séquence d'ADN exogène peut coder pour un ARN anti-sens et/ou un ARNm qui sera ensuite traduit en protéine d'intérêt. Elle peut être de type génomique, de type ADN complémentaire (ADNc) ou de type mixte (minigène, 25 dans lequel au moins un intron est délété). Elle peut coder pour une protéine mature, un précurseur d'une protéine mature, notamment un précurseur destiné à être sécrété et comprenant de ce fait un peptide signal, une protéine chimérique provenant de la fusion de séquences d'origines diverses ou un mutant d'une protéine naturelle présentant des propriétés biologiques améliorées ou modifiées. Un tel mutant peut être 30 obtenu par mutation, délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotide(s) du gène codant pour la protéine naturelle.

Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser :

- 5 - les gènes codant pour des cytokines ou des lymphokines, comme les interférons α , β et γ , les interleukines et notamment l'IL-2, l'IL-6 ou l'IL-10, les facteurs nécrosant des tumeurs (TNF) et les facteurs stimulateurs de colonies (CSF) ;
- 10 - les gènes codant pour des récepteurs cellulaires, comme les récepteurs reconnus par des organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites), de préférence par le virus VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain), ou les ligands de récepteurs cellulaires ;
- les gènes codant pour les hormones de croissance (HGF) ;
- 15 - les gènes codant pour des facteurs de coagulation, comme le facteur VIII et le facteur IX ;
- le gène codant pour la dystrophine ou la minidystrophine ;
- 20 - le gène codant pour l'insuline ;
- les gènes codant pour des polypeptides intervenant directement ou indirectement dans les canaux ioniques cellulaires, comme la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) ;
- 25 - les gènes codant pour des ARN anti-sens ou des protéines capables d'inhiber l'activité d'une protéine produite par un gène pathogène, présent dans le génome d'un organisme pathogène, ou par un gène cellulaire, dont l'expression est dérégulée, par exemple un oncogène ;
- 30 - les gènes codant pour un inhibiteur de protéase comme l' α 1-antitrypsine ou

- 7 -

un inhibiteur d'une protéase virale ;

- 5 - les gènes codant pour des variants de protéines pathogènes qui ont été mutées de façon à altérer leur fonction biologique, comme par exemple des variants trans-dominants de la protéine TAT du virus VIH capables de compétition avec la protéine naturelle pour la liaison à la séquence cible, empêchant ainsi la réplication du VIH ;
- 10 - les gènes codant pour des épitopes antigéniques afin d'accroître l'immunité de la cellule hôte ;
- les gènes codant pour des polypeptides ayant des propriétés anticancéreuses et notamment des suppresseurs de tumeurs comme la protéine p53 ;
- 15 - les gènes codant pour les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I et II, ainsi que les gènes codant pour les protéines régulatrices de l'expression de ces gènes ;
- les gènes codant pour des enzymes cellulaires ou produites par des organismes pathogènes ; et
- 20 - les gènes suicides. On peut citer plus particulièrement le gène TK-HSV-1. L'enzyme TK virale présente une affinité nettement supérieure par rapport à l'enzyme TK cellulaire pour certains analogues de nucléosides (comme l'acyclovir ou le gancyclovir). Elle les convertit en molécules monophosphatées, elles-mêmes convertibles par les enzymes cellulaires, en précurseurs de nucléotides, qui sont toxiques. Ces analogues de nucléotides sont incorporables dans les molécules d'ADN en voie de synthèse, donc principalement dans l'ADN des cellules en état de réplication. Cette
- 25 incorporation permet de détruire spécifiquement les cellules en division comme les cellules cancéreuses.
- 30

- 8 -

- les gènes codant pour un anticorps, un fragment d'anticorps ou une immunotoxine.
 - les gènes rapporteurs comme le gène Lac-Z, codant pour la β -galactosidase
- 5 ou le gène luciférase.

Cette liste n'est pas limitative et bien entendu d'autres gènes peuvent être également employés.

- 10 Par ailleurs, une séquence d'ADN exogène en usage dans la présente invention peut en outre comprendre un gène non-thérapeutique, par exemple un gène codant pour un marqueur de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules hôtes transfectées. On peut citer le gène *neo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une résistance à l'antibiotique G418, le gène *dhfr* (Dihydrofolate
- 15 Réductase), le gène CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), le gène *pac* (Puromycine Acétyl-Transférase) ou encore le gène *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase).

- Bien entendu, un gène en usage dans la présente invention peut être placé sous le
- 20 contrôle d'éléments appropriés à son expression dans une cellule hôte. Par "éléments appropriés", on entend l'ensemble des éléments nécessaires à sa transcription en ARN (ARN anti-sens ou ARNm) et à la traduction d'un ARNm en protéine. Parmi les éléments nécessaires à la transcription, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif ou d'un promoteur régulable et il peut être
- 25 isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou même virale. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène en question. D'une façon générale, un promoteur en usage dans la présente invention, peut être modifié de manière à contenir des séquences régulatrices. A titre d'exemples de promoteurs tissus-spécifiques, on peut citer ceux des gènes d'immunoglobulines lorsque l'on cherche à
- 30 cibler l'expression dans des cellules hôtes lymphocytaires et du gène α 1-antitrypsine pour une expression foie-spécifique. On peut également mentionner les promoteurs

- 9 -

constitutifs du gène TK-HSV-1 (thymidine kinase du virus de l'herpès de type 1), du gène PGK (Phospho Glycerate kinase) murin ou humain, le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus 40), un LTR rétroviral, ou encore le promoteur adénoviral MLP, notamment de l'adénovirus humain de type 2.

5

Le procédé selon l'invention met en oeuvre un mécanisme de recombinaison homologue intermoléculaire. D'une manière générale, il consiste en l'échange de séquences homologues entre deux fragments d'ADN. Ces séquences peuvent être identiques ou substantiellement homologues. En d'autres termes le degré d'homologie
10 des séquences A et B avec la partie correspondante du premier fragment d'ADN peut être variable mais doit être suffisant pour permettre la recombinaison intermoléculaire. Aux fins de la présente invention, il est préférable qu'il soit supérieur à 70%, avantageusement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90% et de manière tout à fait préférée aux environs de 100%. De plus, une courte région d'homologie peut
15 être suffisante (au moins 10 nucléotides consécutifs communs entre les séquences A et B et leurs séquences homologues dans le premier fragment d'ADN). Dans le cadre de la présente invention, la longueur des séquences A et B est de préférence comprise entre 10 pb et 10 kb, avantageusement 20 pb et 5 kb, de préférence 30 pb et 2 kb et, de manière tout à fait préférée, 40 pb et 1 kb.

20

Selon un mode avantageux, un procédé selon l'invention conduit au remplacement du matériel génétique localisé entre les séquences du premier fragment d'ADN homologues aux séquences A et B par la séquence exogène. Cet échange intermoléculaire permet de générer un vecteur viral recombinant circulaire sous forme
25 d'un vecteur procaryotique (plasmide, cosmide ou phage) permettant sa manipulation et/ou sa propagation dans la cellule procaryote. Un mode de réalisation du mécanisme mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention est illustré dans la Figure 2.

Bien que la région d'insertion de la séquence exogène puisse être située à n'importe
30 quelle position du génome viral, on préfère éviter les régions agissant *en cis* nécessaires à la replication. Ces dernières comprennent notamment les LTRs 5' et 3'

ainsi que le signal d'encapsidation dans le cas des rétrovirus et les ITRs 5' et 3' et la région d'encapsidation s'agissant des adénovirus. On indique que la région d'insertion peut être dirigée en des positions variées en fonction des séquences homologues A et B choisies.

5

Comme indiqué précédemment, le premier fragment d'ADN comprend tout ou partie du génome du virus parental en usage dans le cadre de l'invention. Il peut s'agir du génome d'un virus sauvage ou du génome d'un virus en dérivant modifié par délétion, addition et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides. En particulier, il peut être

10

délété d'un ou plusieurs gènes en totalité ou en partie.

Le premier fragment d'ADN est de préférence inclu dans un vecteur conventionnel. Le choix de celui-ci est très large, mais on peut citer plus particulièrement le pBR322, le p polyII ou encore le p poly III*I (Lathe et al., 1987, Gene, 57, 193-201). Selon un

15

mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, le premier fragment d'ADN est de préférence linéarisé au niveau de la région dans laquelle on envisage de cibler l'insertion. En particulier, il peut être clivé par une ou plusieurs enzymes de restriction dont les sites sont localisés entre les séquences du premier fragment d'ADN homologues aux séquences A et B, mais également au niveau de ces dernières bien

20

que ce mode de réalisation ne soit pas préféré. Le choix des sites de restriction à utiliser selon le virus parental retenu est à la portée de l'homme du métier. Avantageusement, on préférera utiliser des sites peu représentés dans le premier fragment d'ADN et en particulier uniques. Par ailleurs, de tels sites peuvent également être créés par les techniques classiques de mutagenèse dirigée.

25

Le second fragment d'ADN en usage dans la présente invention porte notamment la séquence d'ADN exogène entourée des séquences A et B impliquées dans la recombinaison intermoléculaire. On préfère employer un fragment d'ADN linéaire. Il peut être généré par PCR, excisé d'un vecteur quelconque ou produit par voie

30

synthétique ou toute méthode conventionnelle dans le domaine de l'art. A titre d'exemple, un second fragment d'ADN en usage dans le cadre de la présente invention

peut être obtenu par amplification de la séquence d'ADN exogène à partir d'un vecteur de l'art antérieur ou d'une banque génomique ou d'un ADNc adéquat à l'aide d'amorces appropriées munies à leurs extrémités 5' des séquences A et B. En outre, un second fragment d'ADN peut également comprendre des séquences plasmidiques à ses extrémités 5' et 3', qui peuvent éventuellement être utilisées à titre de séquences A et B dans la mesure où elles sont homologues aux séquences plasmidiques contenues dans le premier fragment d'ADN.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un procédé selon l'invention est mis en oeuvre pour la préparation d'un vecteur viral recombinant défectif pour la replication. Ce terme désigne un vecteur incapable d'achever un cycle infectieux autonome dans une cellule hôte. Généralement, le génome de ces vecteurs défectifs est dépourvu d'un ou plusieurs gènes essentiels à la replication, gènes précoces et/ou gènes tardifs. Ils peuvent être délétés en totalité ou en partie ou rendus non fonctionnels par mutation (addition, délétion et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides). A cet égard, un procédé selon l'invention peut permettre la préparation d'un vecteur adénoviral recombinant dépourvu de tout ou partie des régions E1, E2, E3 et/ou E4.

A titre illustratif, on peut citer les modes de réalisation suivants. Lorsqu'il s'agit de préparer dans une cellule procaryote un vecteur adénoviral recombinant dérivant d'un adénovirus humain de type 5 (Ad5) dans lequel on envisage d'insérer une séquence d'ADN exogène à la place de la région E1, on peut mettre en oeuvre (i) un vecteur comportant le génome de l'Ad5 clivé par l'enzyme *ClaI* (site de restriction situé en position 918 du génome Ad5 tel que divulgué dans la banque de données Genebank sous la référence M73260) et (ii) un fragment d'ADN comprenant une séquence A homologue à la région d'encapsidation adénovirale, la séquence d'ADN exogène suivie d'une séquence B homologue à la séquence codant pour la protéine pIX. Par ailleurs, l'usage d'un vecteur portant le génome adénoviral clivé par l'enzyme *SpeI* (position 27082 du génome Ad5) et d'un fragment d'ADN comprenant une séquence A homologue à l'extrémité 5' de la région E2, la séquence d'ADN exogène et une

séquence B homologue à l'extrémité 3' de la région E4 permettra de préparer un vecteur adénoviral recombinant dans lequel la séquence d'ADN exogène est insérée à la place de la région E3. Bien entendu, ces modes de réalisation particuliers ne sont cités qu'à titre d'exemples. Enfin, le procédé selon l'invention peut être utilisé pour
5 introduire des délétions, mutations et/ou substitutions dans une région particulière d'un génome viral.

La présente invention s'avère particulièrement avantageuse lorsqu'il s'agit de préparer un vecteur viral recombinant d'au moins 20 kb et, de manière tout à fait préférée, d'au
10 moins 30 kb et plus particulièrement d'un vecteur ayant un génome d'une longueur de 80 à 120% de celle du génome du virus sauvage correspondant, notamment de 90 à 110% et, de préférence, de 95 à 105%.

Selon un autre mode de réalisation, un procédé selon l'invention peut également être
15 employé pour insérer au moins deux fragments d'ADN au sein du génome viral, par recombinaison intermoléculaire entre (i) un premier fragment d'ADN comprenant tout ou partie dudit génome du virus parental, (ii) un second fragment d'ADN comprenant une première partie de ladite séquence d'ADN exogène munie à son extrémité 5' de ladite séquences flanquantes A et (iii) un troisième fragment d'ADN comprenant une
20 deuxième partie de ladite séquence d'ADN exogène munie à son extrémité 3' de ladite séquences flanquantes B ; lesdits seconds et troisièmes fragments d'ADN comportant une séquence homologue se recouvrant à leurs extrémités 3' et 5' respectives. A titre indicatif, ces séquences homologues entre les seconds et troisièmes fragments d'ADN répondent aux mêmes critères d'homologie et de longueur que les séquences A et B.
25 Ce mode de réalisation spécifique est particulièrement avantageux pour le clonage des séquences exogènes de grande taille.

Un procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre dans toute cellule procaryote et notamment dans une bactérie dérivée d'une souche d'*Escherichia coli*. Mais, on
30 préfère tout particulièrement employer une souche recBC sbcBC comme par exemple les souches CES200, CES201, W5449 et BJ5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol., 166,

557-580).

Une procédure typique d'un procédé selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- 5 (a) on co-introduit ou on introduit de manière séparée dans une cellule procaryote un premier fragment d'ADN et (ii) un second fragment d'ADN tels que définis précédemment,
- (b) on cultive la cellule procaryote obtenue à l'étape (a) dans des conditions
- 10 appropriées pour permettre la génération du vecteur viral recombinant par recombinaison intermoléculaire, et
- (c) on récupère le vecteur viral recombinant.
- 15 Dans le cadre d'un procédé selon l'invention, les quantités de premiers et seconds fragments d'ADN peuvent varier. On préfère employer une concentration 10 fois plus importante de second fragment par rapport au premier. L'introduction des fragments d'ADN dans une cellule procaryote et la récupération du vecteur de ces mêmes
- 20 cellules sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire détaillées dans Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

La présente invention concerne également un procédé pour préparer une particule virale infectieuse contenant un vecteur viral recombinant obtenu en mettant en oeuvre

25 un procédé selon l'invention, selon lequel :

- (a) on introduit ledit vecteur viral recombinant dans une cellule mammifère pour générer une cellule de mammifère transfectée,
- 30 (b) on cultive ladite cellule de mammifère transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et

(c) on récupère ladite particule virale de la culture cellulaire obtenue à l'étape (b).

Les cellules peuvent être transfectées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer notamment la technique au phosphate de calcium, la technique au DEAE dextran, l'électroporation, les méthodes basées sur les chocs osmotiques, la microinjection ou les méthodes basées sur l'emploi de liposomes. Selon un mode de réalisation préféré, la cellule mammifère est avantageusement une cellule de complémentation et notamment la cellule 293 dans le cadre d'un vecteur dérivant d'un adénovirus. Les particules virales peuvent être récupérées du surnageant de culture, mais également des cellules selon les protocoles conventionnels.

La présente invention couvre également l'usage d'une particule virale infectieuse ou d'un vecteur viral recombinant préparé selon un procédé selon l'invention, pour le traitement thérapeutique ou chirurgical du corps humain et notamment par thérapie génique. Un procédé selon l'invention est plus particulièrement destiné au traitement préventif ou curatif de maladies telles que les maladies génétiques (hémophilie ; thalassémies, emphyseme, maladie de Gaucher, mucoviscidose, myopathie de Duchène ou de Becker...) les cancers, les maladies virales (SIDA., infections herpétiques ou dues au cytomégalovirus ou au papillomavirus). Aux fins de la présente invention, les vecteurs et particules virales préparés par un procédé selon l'invention peuvent être introduits soit *in vitro* dans une cellule hôte prélevée du patient, soit directement *in vivo* dans l'organisme à traiter. De préférence, la cellule hôte est une cellule humaine et, de manière préférée une cellule pulmonaire, fibroblastique, musculaire, hépatique, lymphocytaire ou une cellule de la lignée hématopoïétique.

La présente invention vise également une composition pharmaceutique comprenant une quantité thérapeutiquement efficace d'une particule virale infectieuse ou d'un vecteur viral recombinant préparé selon un procédé selon l'invention, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Une telle composition pharmaceutique peut être préparée selon les techniques communément en usage et

administrée par toute voie d'administration connue, par exemple par voie systémique (notamment intraveineuse, intratrachéale, intrapéritonéale, intramusculaire, sous-cutanée intratumorale ou intracrânienne) ou par aérosolisation ou instillation intrapulmonaire.

5

Enfin, la présente invention a également pour objet l'usage d'une particule virale infectieuse ou d'un vecteur viral recombinant préparé selon un procédé selon l'invention, pour l'expression d'une séquence d'ADN d'intérêt dans un système cellulaire.

10

La présente invention est plus complètement décrite en référence aux figures suivantes et à l'aide des exemples suivants.

15

La Figure 1 est une représentation schématique du génome de l'adénovirus humain de type 5 (représenté en unités arbitraires de 0 à 100), indiquant l'emplacement des différents gènes.

20

La Figure 2 illustre un procédé de recombinaison intermoléculaire entre deux fragments d'ADN. les séquences plasmidiques sont représentées par un trait fin, les séquences virales par un trait gras et la séquence exogène par une boîte hachurée.

25

La Figure 3 est une représentation schématique du vecteur pTG3614 correspondant au p polyII dans lequel est cloné le génome d'un adénovirus recombinant modifié dans la région E1 par insertion d'une cassette d'expression du gène FIX humain.

30

La Figure 4 est une représentation schématique du vecteur pTG4652 correspondant au p polyII dans lequel est cloné le génome d'un adénovirus recombinant modifié dans les régions E1, E3 et E4 par insertion d'une cassette d'expression du gène CF humain et délétions partielles.

EXEMPLES

Les exemples suivants n'illustrent qu'un mode de réalisation de la présente invention.

- 5 Les constructions décrites ci-après sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de biologie moléculaire détaillées dans Maniatis et al (1989, *supra*). Les sites de restriction protubérants en 5' peuvent être convertis en sites francs par traitement par le grand fragment Klenow de l'ADN polymérase d'*E. coli* alors que les sites protubérants en 3' sont traités par la T4 polymérase. En ce qui concerne les
- 10 étapes d'amplification par PCR, on applique le protocole tel que décrit dans PCR Protocols-A guide to methods and applications (1990, ed Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc.). Les cellules sont transfectées par les méthodes conventionnelles et sont cultivées selon les recommandations du fournisseur. Les fragments insérés dans les différentes constructions décrites ci-après sont indiqués
- 15 précisément selon leur position dans le génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genbank sous la référence M73260.

EXEMPLE 1 : Construction d'un vecteur viral recombinant dérivé d'un adénovirus
humain de type 5 sous forme d'un plasmide bactérien

20

A. Clonage du génome d'Adénovirus 5 (Ad5) dans p polyII

- On synthétise l'extrémité gauche du génome d'Ad5 (nucléotides 1 à 935) par PCR à l'aide des amorces oligonucléotidiques oTG6597 (SEQ ID NO: 1) et oTG6598 (SEQ
- 25 ID NO: 2). La première s'hybride aux 21 premiers nucléotides de l'ITR 5' et présente un site *PacI*, immédiatement en amont des séquences virales, et un site *EcoRI* utilisé pour le clonage. La deuxième amorce permet l'introduction des sites *SaII* puis *BglII* en aval des séquences virales. La matrice engagée dans cette réaction est l'ADN génomique d'Ad5 préparé selon les méthodes conventionnelles. On digère le fragment
- 30 ainsi amplifié par *EcoRI* et *BglII* et on le clone dans le plasmide p polyII (Lathe et al., 1987, *supra*) préalablement clivé par ces deux mêmes enzymes de restriction pour

obtenir le pTG1692.

On prépare le fragment d'ADN correspondant à l'extrémité droite du génome d'Ad5 (nucléotides 35103 à 35935) suivant le même principe en utilisant le couple
5 d'oligonucléotides oTG6599 (SEQ ID NO: 3) et oTG6597 (SEQ ID NO: 1). On construit le pTG1693 en insérant le fragment amplifié digéré par *EcoRI* et *BglII* dans les mêmes sites de p polyII. On excise de pTG1693 un fragment *BglII*-*BamHI* portant les séquences amplifiées de façon à l'introduire dans le site *BglII* de pTG1692 en aval des séquences 5' adénovirales. Le pTG3601 ainsi obtenu est linéarisé entre les
10 extrémités gauche et droite du génome d'Ad5 par digestion avec les enzymes de restriction *BglII* ou *SalI*. Les extrémités ainsi générées sont rendues franches par l'action du fragment klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli*. Des bactéries BJ5183 (Hanahan, 1983 *supra*) rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium sont co-transformées avec la préparation précédente et l'ADN génomique d'Ad5. Les
15 colonies obtenues sont analysées par cartographie de restriction. On sélectionne un clone désigné pTG3602 généré par recombinaison homologue intermoléculaire dans lequel les séquences adénovirales (nucléotides 936 à 35102) ont été insérées entre les deux fragments produits par PCR, de manière à générer un vecteur plasmidique comprenant le génome complet de l'Ad5 - pTG3602 est produit dans les bactéries
20 C600 (Huynh et al., 1985 DNA cloning, Volume I, ed. Glover, IRL Press Limited : Oxford, England p56-110).

B. Evaluation du pouvoir infectieux de pTG3602

25 On libère le génome viral par l'action de l'enzyme de restriction *PacI*. Des cellules 293 cultivées en monocouche sont transfectées avec le produit de cette digestion par la technique de précipitation au phosphate de calcium. On peut également utiliser d'autres cellules sensibles, par exemple les cellules A549 (ATCC CCL185). On fait croître les cellules sous agar pendant 9 à 14 jours, période durant laquelle l'apparition
30 de plages de lyse sur le tapis cellulaire témoigne de la production de particules virales infectieuses et donc, de la capacité du génome d'Ad5 issu de pTG3602 à se répliquer.

C. Construction d'un vecteur adénoviral recombinant déficient dans lequel le gène exogène remplace la région précoce E1.

On utilise un plasmide dans lequel le gène rapporteur Lac Z codant pour la β -galactosidase est placé dans un contexte viral ; par exemple un plasmide dérivé du pMLP-Adk7 (Stratford-Perricaudet et Perricaudet, 1991, Human Gene Transfer, 219, 51-61) comprenant les séquences 5' de l'Ad 5 (nucléotides 1 à 458), le promoteur MLP Ad2, le gène Lac Z, le signal de polyadénylation du virus SV40 et les séquences Ad5 comprises entre les nucléotides 3329 à 6241.

10

La cassette d'expression du gène Lac Z ceinte de séquences adénovirales est excisée par l'action des enzymes de restriction *Bsr*GI (position 192 sur le génome d'Ad5) et *Pst*I (position 3788) puis purifiée. Le pTG3602 est linéarisé au niveau du site *Cla*I (position 918) puis traité avec la klenow. Les deux fragments obtenus sont co-transformés dans des bactéries BJ5183 compétentes. Une recombinaison au niveau des séquences adénovirales homologues entraîne le remplacement de la région E1 d'Ad5 (nucléotides 459 à 3328) par la cassette d'expression du gène rapporteur dans le plasmide pTG3603.

15

Son pouvoir infectieux est vérifié par transfection d'un tapis de cellules 293 transfectées avec pTG3603 préalablement digéré par *Pac*I. Les plages de lyse formées sont alors piquées et les particules virales remises en suspension et utilisées pour infecter une monocouche de cellules 293. La coloration des cellules en bleu après addition de X-Gal témoigne de l'expression du gène Lac Z.

25

D. Construction d'un vecteur adénoviral recombinant dans lequel le gène exogène remplace la région précoce E3

Une cassette d'expression du gène codant pour la protéine gp19 de la région E3 d'Ad5 (nucléotides 28731 à 29217) est assemblée dans le bactériophage M13mp18 (Gibco BRL) par clonage de deux fragments PCR l'un correspondant au LTR 3' de RSV

30

- 19 -

(Rous Sarcoma Virus) (amorces oligonucléotidiques oTG5892-SEQ ID NO: 4 et 5893-SEQ ID NO: 5) et l'autre à la séquence codant pour la gp19 (oTG5455-SEQ ID NO: 6 et 5456-SEQ ID NO: 7). On obtient le vecteur M13TG1683, dont on excise la cassette d'expression par une digestion *Xba*I. Après traitement avec la klenow, il est introduit dans le site *Bsm*I (rendu franc par action de l'ADN polymérase du phage T4) de pTG8519. Celui-ci dérive du plasmide puc19 (Gibco BRL), dans lequel on a inséré les séquences adénovirales comprises entre le site *Spe*I et l'extrémité droite du génome (nucléotides 27082 à 35935) mais dépourvues de la majorité de la région E3 (nucléotides 27871 à 30758). On obtient le pTG1695 dont on remplace le fragment *Sca*I-*Spe*I, porteur des séquences plasmidiques, par un fragment équivalent purifié de pTG1659. Celui-ci correspond au puc19 comprenant les séquences de l'Ad5 s'étendant des nucléotides 21562 à 35826. Le pTG1697 ainsi obtenu présente des séquences adénovirales qui s'étendent du site *Bam*HI (position 21562) à l'ITR 3' (position 35935) dans lesquelles la région E3 est remplacée par une cassette d'expression de la gp19 sous contrôle du promoteur constitutif RSV. Le fragment *Dra*I (position 22444 et 35142 sur le génome d'Ad5) est purifié, et co-introduit dans les bactéries BJ-5183 compétentes avec pTG3602 linéarisé par *Spe*I et traité par la klenow. Les recombinants porteurs d'un plasmide généré par recombinaison sont criblés pour la présence du promoteur RSV. Le pTG3605, vecteur plasmidique porteur du génome d'Ad-gp19+, est ainsi mis en évidence.

Le pouvoir infectieux génome viral excisé du plasmide pTG3605 est testé suivant le protocole déjà décrit précédemment. La production d'une protéine gp19 fonctionnelle est suivie par co-immunoprécipitation des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et de celle-ci (Burgert et Kvist, 1985, Cell, 41, 987-997).

E. Construction d'un vecteur adénoviral recombinant défectif dans lequel les deux régions précoces E1 et E3 sont remplacées par des gènes exogènes

Les cellules BJ-5183 sont co-transformées par le fragment *Dra*I isolé de pTG1697

mentionné ci-dessus et le fragment *SpeI* (Klenow) isolé de pTG3603. Le plasmide résultant est testé dans les mêmes conditions que précédemment.

F. Construction d'un vecteur adénoviral recombinant exprimant le gène FIX

5

Le cDNA codant pour le FIX humain a été cloné sous forme d'un fragment *BamHI* dans le plasmide pTG381. Dans ce dernier, l'extrémité 5' non codante du gène FIX a été modifiée de manière à être conforme aux règles de Kozak. Le plasmide pTG381 est décrit dans la publication du brevet FR 2 600 334. Le gène FIX est recloné dans
10 le site *BamHI* de pTG6512, pour donner pTG4375. pTG6512 dérive du vecteur pTG6511 après délétion du promoteur tardif majeur (MLP) de l'Ad2 et remplacement par un polylinker. A titre indicatif, la construction du pTG6511 est détaillée à l'exemple 1 de la demande internationale WO 94/28152. Le promoteur PGK murin est isolé par les méthodes conventionnelles à partir d'ADN génomique de souris selon
15 Adra et al. (1987, *Gene* 60, 65-74) ou à l'aide d'amorces adéquates créées à partir des données de séquence divulguées dans la banque de données Genbank sous la référence X15339. Des sites de restriction *PstI* sont inclus aux extrémités 5' des amorces afin de faciliter les étapes de clonage ultérieures. Le fragment portant le promoteur PGK est traité par la T4 polymérase puis introduit en amont du gène
20 humain FIX dans le site *HpaI* de pTG4375 dont on excise par digestion *MscI* un fragment dit "de remplacement" comportant la cassette FIX entourée de séquences adénovirales E1 (185pb en 5' et 2045pb en 3').

Celui-ci est cotransformé dans les bactéries BJ5183 en présence du vecteur pTG3602
25 digéré par *ClaI* (position 918). Les transformants sont sélectionnés sur ampicilline et analysés par cartographie de restriction. On retient le clone désigné pTG3614 correspondant à un vecteur adénoviral comportant le gène thérapeutique FIX à la place de la région E1 (Figure 3). Un stock viral est constitué de manière conventionnelle, par transfection du génome adénoviral libéré par digestion *PacI* dans
30 la lignée 293. Après une étape d'amplification, les cellules sont lysées et les particules virales AdTG3614 purifiées par centrifugation sur chlorure de césium.

La capacité à transférer et exprimer le gène FIX est évaluée en modèle animal souris. Pour ce faire, $1,5 \times 10^9$ ufp sont injectées dans la veine caudale de souris femelles C57 Black 6 âgées de 5 à 6 semaines. Des échantillons de sang sont prélevés régulièrement sur lesquels on dose la quantité de FIX humain par ELISA (Kit Diagnostica Stago, Asnières, France ; Asserachirom[®] IX : Ag 00564). Le FIX est détecté dans le serum de souris pendant plusieurs semaines avec un maximum à 5 jours.

G. *Construction d'un vecteur adénoviral modifié dans la région E2*

Lors du cycle viral normal, l'expression des gènes de la région E2 est induite par les produits précoces de E1 et E4 et on observe une production abondante des protéines codées par E2 et, en particulier, de la protéine DBP (pour DNA Binding Protein). Or, cette expression élevée peut être problématique *in vivo* (induction de réponses inflammatoires ou interférence avec l'expression du transgène). C'est pourquoi, des vecteurs adénoviraux défectifs pour la fonction E2A ont été construits soit par introduction d'une mutation thermosensible dans E2A (position 22795 ; C en T résultant en un changement Pro en Ser) ou par d'une délétion partielle du gène DBP.

Le vecteur pTG9551 portant la mutation thermosensible est généré par recombinaison homologue dans les cellules BJ entre pTG3601 digéré par *Bgl*II et l'ADN génomique purifié du virus Ad5Hts 125 (Ensinger et Ginsberg, 1972, J. Virol. 10, 328-339). Le génome ainsi reconstitué est libéré par digestion *Pac*I et transfecté dans les cellules 293 qui sont incubées à 32°C pour la production des particules virales (la température non permissive est 39°C).

La défectuosité de E2A peut également être générée par délétion partielle des régions codantes du gène DBP en évitant les régions recouvrant d'autres cadres de lecture. La construction est réalisée par recombinaison homologue entre pTG3601 *Bgl*II et l'ADN viral préparé à partir du virus H5dl802 (Rice et Klessig, 1985, J. Virol. 56, 767-778). Les virus peuvent être produits dans une lignée de complémentation appropriée trans-complémentant la fonction DBP, par exemple la lignée 293 transfectée par un vecteur

permettant l'expression constitutive ou régulée du gène DBP.

H. Construction d'un vecteur adénoviral modifié dans la région E4

5 Dans un premier temps, on construit un vecteur dit "de remplacement" comprenant une cassette d'expression du gène codant pour la protéine CFTR placée au sein de la région adénovirale E1. Ce vecteur désigné pTG8585 contient les éléments suivants, tous décrits dans la littérature :

- l'ITR 5' Ad5 (positions 1 à 458),
- 10 - le promoteur MLP Ad2,
- le cDNA CFTR humain,
- le signal de polyadénylation du gène de la β -globine de lapin,
- le LTR 3' du virus RSV (Rous Sarcoma virus),
- les séquences adénovirales codant pour la protéine gp19 (positions 28731 à
- 15 29217 de l'Ad5), et
- la partie 3' de la région E1B (position 3329 à 6241).

En parallèle, les séquences adénovirales recouvrant les régions E3 et E4 sont sous-clonées dans le vecteur p poly II et déletées par les techniques classiques de biologie

20 moléculaire. On élimine les séquences E3 (positions 28592 à 30470) par digestion *XbaI* et les séquences E4 (positions 32994 à 34998). Le génome adénoviral ainsi modifié est reconstitué par recombinaison homologue entre un fragment de remplacement portant ces modifications isolé du vecteur précédent et pTG3603 digéré par *SpeI*. On obtient pTG8595 portant un génome adénoviral recombinant (gène Lac

25 Z à la place de la région E1) et déficient pour les fonctions E3 et E4.

Les cassettes d'expression des gènes CFTR et gp19 indiquées ci-dessus sont introduites dans pTG8595 en remplacement du gène Lac Z par co-transformation des

30 cellules BJ5183 par le fragment *PacI* - *BstEII* isolé de pTG8585 et le vecteur pTG8595 linéarisé par *ClaI*. On génère pTG4652 (Figure 4) qui peut être propagé dans une lignée cellulaire complétant les fonctions E1 et E4 déficientes telles que

décrites dans la demande internationale WO94/28152.

Les particules virales sont amplifiées, les cellules lysées et les extraits cellulaires totaux sont analysés pour l'expression du gène CFTR par Western blot (gel SDS-PAGE
5 8 %). Les filtres sont incubés en présence d'une dilution au 1/5000 de l'anticorps monoclonal MAB 1104 dirigé contre un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 722 à 734 de la protéine CFTR humaine. La détection est réalisée par la méthode ECL (Enhanced ChemiLuminescence ; kit Amersham). On observe dans les extraits de cellules infectées par AdTG4652 une bande de forte intensité et assez
10 diffuse correspondant à un produit de poids moléculaire élevé comigrant avec un témoin CFTR. Cette bande n'est pas présente dans les extraits issus du virus parental pTG8595 qui ne contient pas la cassette d'expression CFTR.

15 EXEMPLE 2 : Construction d'un vecteur viral recombinant dérivé de l'Adénovirus canin 2 (CAV2) sous forme d'un plasmide bactérien

A. *Clonage du génome de CAV2 dans p poly II*

Le génome de CAV 2 est cloné dans ppolyII SfiI-NotI 14 (Lathe et al., 1987, *supra*)
20 et modifié pour générer des vecteurs recombinants en utilisant les sites adéquats suivant les mêmes procédés que ceux utilisés dans le cas de la manipulation d'Ad5. Les extrémités gauche (nucléotides 1 à 810 suivant la numérotation de la séquence D04368 de Genbank) et droite (nucléotides ~27600 à la fin) sont synthétisées par PCR entre les couples d'amorces oligonucléotidiques oTG6974 (SEQ ID NO: 8) et
25 oTG6975 (SEQ ID NO: 9) et oTG6976 (SEQ ID NO: 10) et oTG6974, respectivement. Elles sont assemblées par l'intermédiaire du site *Pst*I introduit lors de la PCR à la suite des séquences virales, dans le cas de l'extrémité gauche, et cartographié à approximativement 1200 pb de la fin du génome, dans le cas de l'extrémité droite. Des bactéries compétentes BJ5183 sont co-transformées avec le
30 plasmide ainsi obtenu linéarisé par *Pst*I et l'ADN de CAV2. L'introduction des séquences virales manquantes (nucléotides 811 à 27600) est réalisée par

recombinaison homologue. Le génome de CAV2 porté par le plasmide résultant est excisé par l'intermédiaire des sites *NotI* introduits lors de la PCR puis transfecté dans une monocouche de cellules MDCK (ATCC CCL34). Les étapes suivantes sont décrites dans l'exemple 1.

5

B. Construction d'un vecteur adénoviral recombinant d'origine canine

L'ADN génomique de virus CAV2 (souche Toronto A 26/61 ; ATCC VR-800) est préparé par la technique classique (amplification sur lignée rénale de chien MDCK
10 GHK ..., lyse des cellules, purification des virus par centrifugation sur chlorure de césium, traitement à la protéinase k et enfin extraction au phénol / chloroforme). Le génome CAV2, qui a une longueur de 31 kpb est introduit dans un vecteur plasmidique par recombinaison homologue. Pour ce faire, on isole les extrémités gauche et droite du génome CAV2 par PCR et digestion enzymatique en incorporant
15 un site *NotI* immédiatement au-delà des ITRs 5' et 3'. Le vecteur pTG4457 est obtenu par introduction dans p poly II de la partie 5' du génome viral jusqu'au site *BstBI* (position 870) suivie de la partie 3' à partir du site *SaII* (position 27800). Le génome complet peut être reconstitué par cotransformation entre l'ADN génomique (100 à 500 ng) et pTG4457 digéré par *BstBI* (10 à 100 ng). Le génome viral peut être excisé
20 du vecteur précédent pTG5406 par digestion *NotI*. On vérifie que l'ADN est infectieux par transfection de 1 à 5 µg dans les cellules de chien MDCK ou GHK. On observe la production de plages.

Le vecteur recombinant est obtenu de la façon suivante :

25

L'extrémité gauche du CAV2 est sous clonée et modifiée de manière à déleter les séquences codantes E1A en totalité et E1B partiellement. Ceci est effectué par digestion *NarI* puis réintroduction d'un fragment amplifié par PCR recouvrant la région d'encapsidation, la région promotrice E1A et le site d'initiation de la
30 transcription. Les amorces sont conçues de manière à intégrer également un site de restriction unique *XbaI*. On obtient pTG5407 dans lequel on introduit au niveau du

site *Xba*I le gène CAT ou Lac Z (pTG5408). Ce dernier est digéré par *Xho*I et on insère la partie 3' du génome viral sous forme d'un fragment *Sa*I (position 27800 à la fin de l'ITR 3'). Le vecteur pTG5409 ainsi obtenu est linéarisé par *Sa*I et co-transformé dans *E.coli* BJ5183 avec le génome CAV-2 digéré par *Sma*I. On obtient

5 un vecteur adénoviral d'origine canine portant le gène reporteur CAT à la place de la région E1.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Transgene S.A.
- (B) RUE: 11 rue de Molsheim
- (C) VILLE: Strasbourg
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 67082
- (G) TELEPHONE: (33) 88 27 91 00
- (H) TELECOPIE: (33) 88 22 58 07

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveau procede de preparation d'un vecteur viral

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 10

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: adenovirus humain
- (B) SOUCHE: serotype 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6597

- 27 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCCGAATTCT TAATTAACAT CATCAATAAT ATACCTTA

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: adenovirus humain
- (B) SOUCHE: serotype 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6598

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GACAGATCTG TCGACGTGGC AGGTAAGATC GATCA

35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- 28 -

- (A) ORGANISME: adenovirus humain
- (B) SOUCHE: serotype 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6599

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

AGGAGATCTG TCGACTCTCA AACATGTCTG CGGGT

35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 47 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Rous sarcoma virus
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG5892

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GTCGTAGGAT CCAGCTGCTC CCTGCTTGTC TGTTGGAGGT CGCTGAG

47

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 47 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

- 29 -

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Rous sarcoma virus

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG5893

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GTAGCTGACG TCCCAGGTGC ACACCAATGT GGTGAATGGT CAAATGG

47

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 25 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: adenovirus humain

(B) SOUCHE: serotype 5

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG5455

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

ATCGGAATTC AAGATGATTA GGTAC

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 28 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- 30 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: adenovirus humain

(B) SOUCHE: serotype 5

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG5456

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

ATCGTCTAGA TTAAGGCATT TTCTTTTC

28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 36 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: adenovirus canin

(B) SOUCHE: CAV-2

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6974

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CAGGGATCCG CGGCCGCATC ATCAATAATA TACAGG

36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 29 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

- 31 -

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: adenovirus canin

(B) SOUCHE: CAV-2

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6975

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CTGCTGCAGT CAGAAATGCT AGCAGGAGA

29

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 27 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: adenovirus canin

(B) SOUCHE: CAV-2

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6976

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

TGCGGATCCA CAGACTAAGC GGAGGTA

27

Revendications

1. Procédé pour préparer dans une cellule procaryote un vecteur viral recombinant dérivé d'un virus parental dans le génome duquel est insérée une
5 séquence d'ADN exogène, par recombinaison intermoléculaire entre (i) un premier fragment d'ADN comprenant tout ou partie dudit génome du virus parental et (ii) un second fragment d'ADN comprenant ladite séquence d'ADN exogène entourée de séquences flanquantes A et B homologues à (i).
- 10 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le virus parental est sélectionné parmi le groupe constitué par les adénovirus, les rétrovirus, les virus associés aux adénovirus, les poxvirus et les virus de l'herpès.
- 15 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le virus parental est un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore un adénovirus hybride.
- 20 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le virus parental est un adénovirus d'origine canine de type CAV-2.
5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le virus parental est un adénovirus d'origine humaine de sérotype C.
- 25 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le virus parental est un adénovirus d'origine humaine de type 5.
- 30 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite séquence d'ADN exogène code pour un polypeptide d'intérêt thérapeutique sélectionné parmi le groupe constitué par les facteurs de coagulation, les hormones de croissance, les cytokines, les lymphokines, les polypeptides suppresseurs de tumeurs, les récepteurs cellulaires, les ligands de récepteurs

cellulaires, les inhibiteurs de protéases, les anticorps, les toxines, les immunotoxines, la dystrophine et les polypeptides intervenant dans les canaux ioniques cellulaires tels que la protéine CFTR.

- 5 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les séquences flanquantes homologues A et B ont une longueur de 10pb à 10kb, avantageusement de 20 pb à 5kb, de préférence de 30 pb à 2 kb et de manière tout à fait préférée de 40 pb à 1kb.
- 10 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le premier fragment d'ADN est linéarisé au niveau de la région d'insertion de la séquence exogène.
- 15 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, pour la préparation d'un vecteur viral recombinant défectif pour la replication.
- 20 11. Procédé selon la revendication 10, pour la préparation d'un vecteur adénoviral recombinant dépourvu de tout ou partie d'au moins une région essentielle à la replication sélectionnée parmi les régions E1, E2 et E4.
- 25 12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le vecteur adénoviral recombinant est en outre dépourvu de tout ou partie de la région E3.
- 30 13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, pour la préparation d'un vecteur viral recombinant d'au moins 20 kb.
- 30 14. Procédé selon la revendication 13, pour la préparation d'un vecteur viral recombinant d'au moins 30 kb.
- 30 15. Procédé selon les revendications 1 à 14, par recombinaison intermoléculaire entre (i) un premier fragment d'ADN comprenant tout ou partie dudit génome

du virus parental, (ii) un second fragment d'ADN comprenant une première partie de ladite séquence d'ADN d'intérêt munie à son extrémité 5' de ladite séquences flanquantes A et (iii) un troisième fragment d'ADN comprenant une deuxième partie de ladite séquence d'ADN d'intérêt munie à son extrémité 3' de ladite séquences flanquantes B ; lesdits seconds et troisièmes fragments d'ADN comportant une séquence homologues à leurs extrémités 3' et 5' respectives.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, pour introduire une modification par délétion, mutation et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides ou une séquence d'ADN exogène dans un génome viral.

17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que ladite cellule procaryote est dérivée d'une souche d'*Escherichia coli* recBC sbcBC.

18. Procédé pour préparer une particule virale infectieuse contenant un vecteur viral recombinant obtenu en mettant en oeuvre un procédé selon l'une des revendications 1 à 17, selon lequel :

(a) on introduit ledit vecteur viral recombinant dans une cellule mammifère pour générer une cellule de mammifère transfectée,

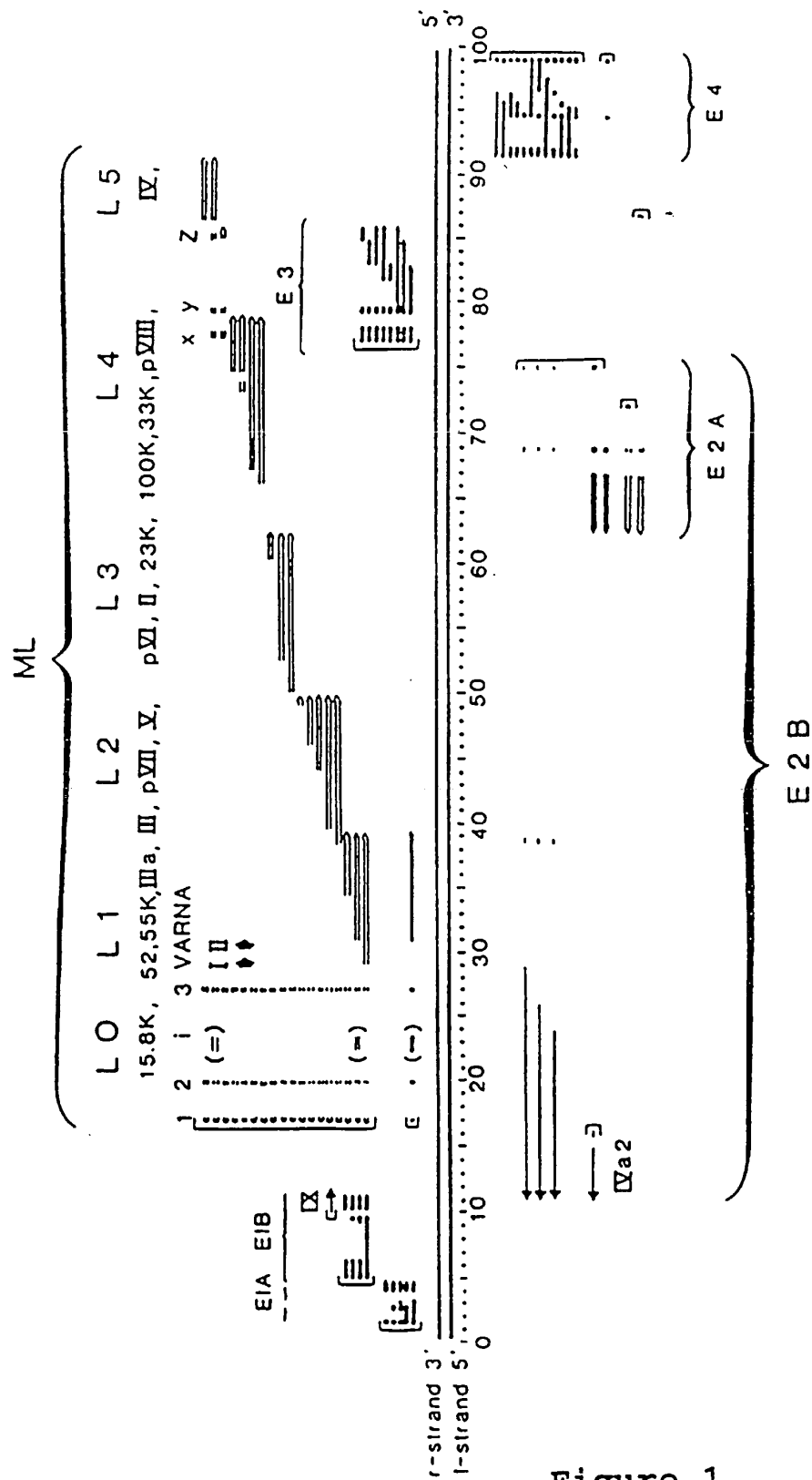
(b) on cultive ladite cellule de mammifère transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et

(c) on récupère ladite particule virale de la culture cellulaire obtenue à l'étape (b).

19. Usage d'une particule virale infectieuse préparée selon la revendication 18 ou d'un vecteur viral recombinant préparé selon l'une des revendications 1 à 17,

pour le traitement thérapeutique ou chirurgical du corps humain.

20. Usage selon la revendication 19 pour le traitement thérapeutique ou chirurgical du corps humain par thérapie génique.
- 5
21. Composition pharmaceutique comprenant une quantité thérapeutiquement efficace d'une particule virale infectieuse préparée selon la revendication 18 ou d'un vecteur viral préparé selon l'une des revendications 1 à 17, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.
- 10
22. Usage d'une particule virale infectieuse préparée selon la revendication 18 ou d'un vecteur viral recombinant préparé selon l'une des revendications 1 à 17, pour l'expression d'une séquence d'ADN d'intérêt dans un système cellulaire.
- 15
23. Usage d'une souche d'*E. coli* recBC sbcBC pour le clonage de fragments d'ADN dans un vecteur plasmidique par recombinaison homologue intermoléculaire.



2 / 4

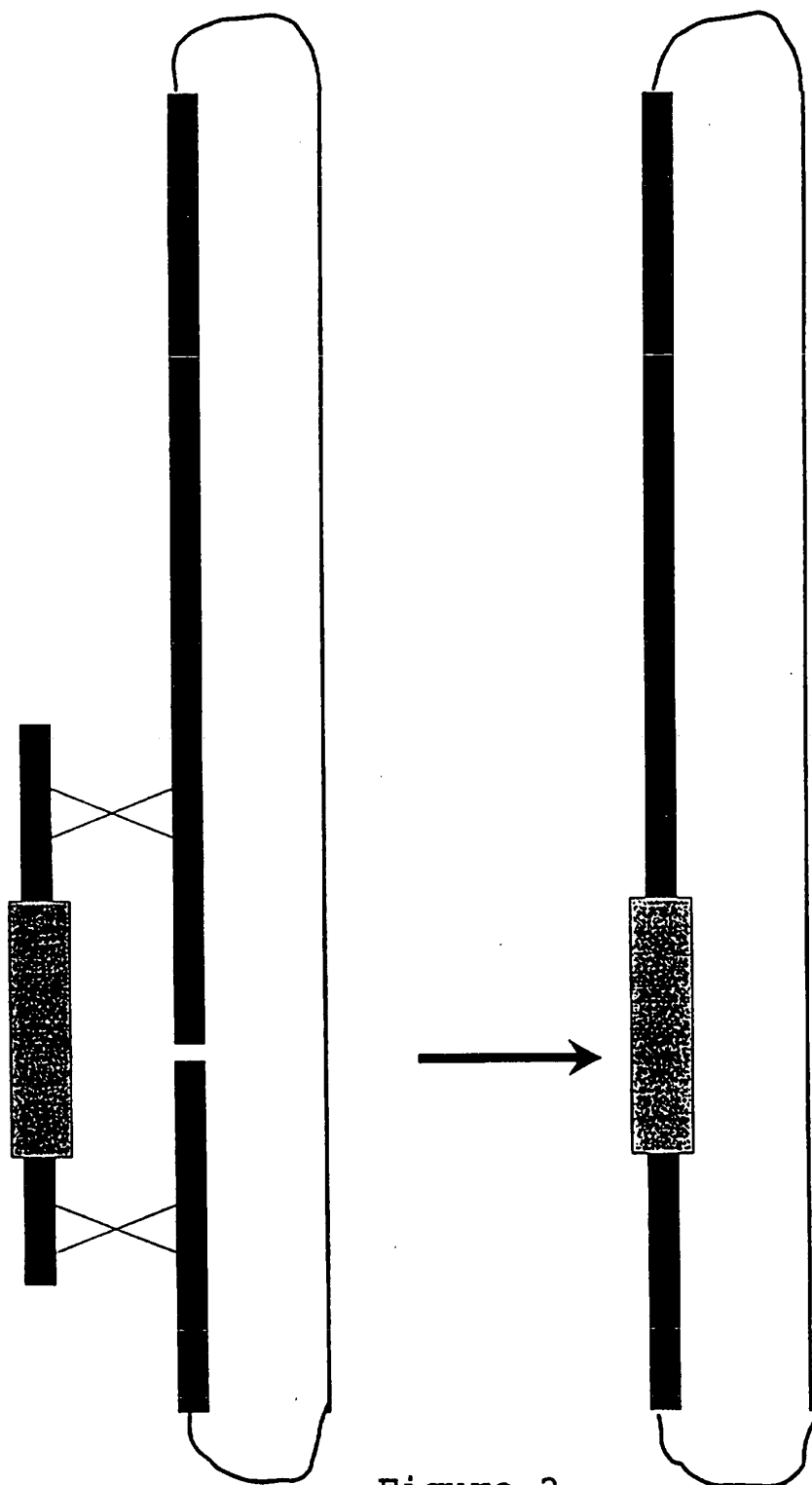


Figure 2

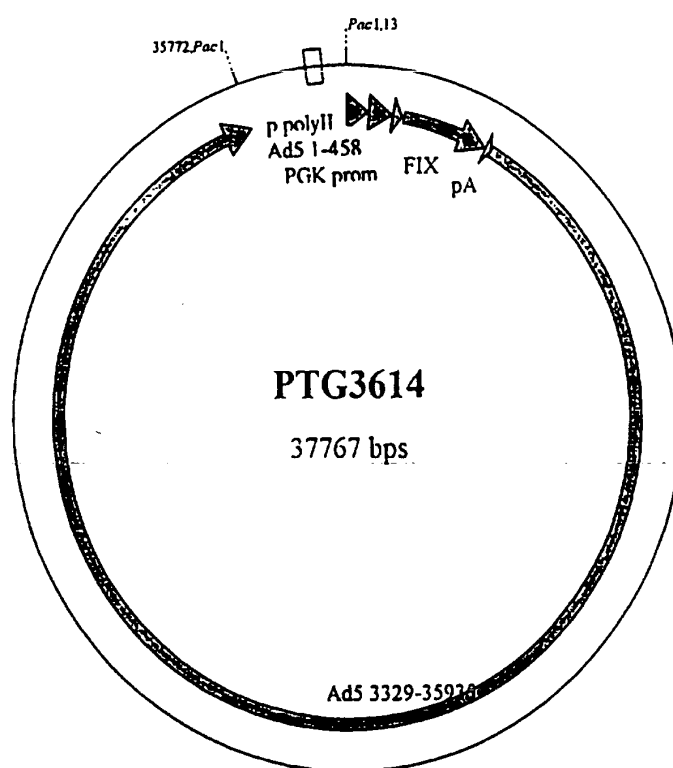


Figure 3

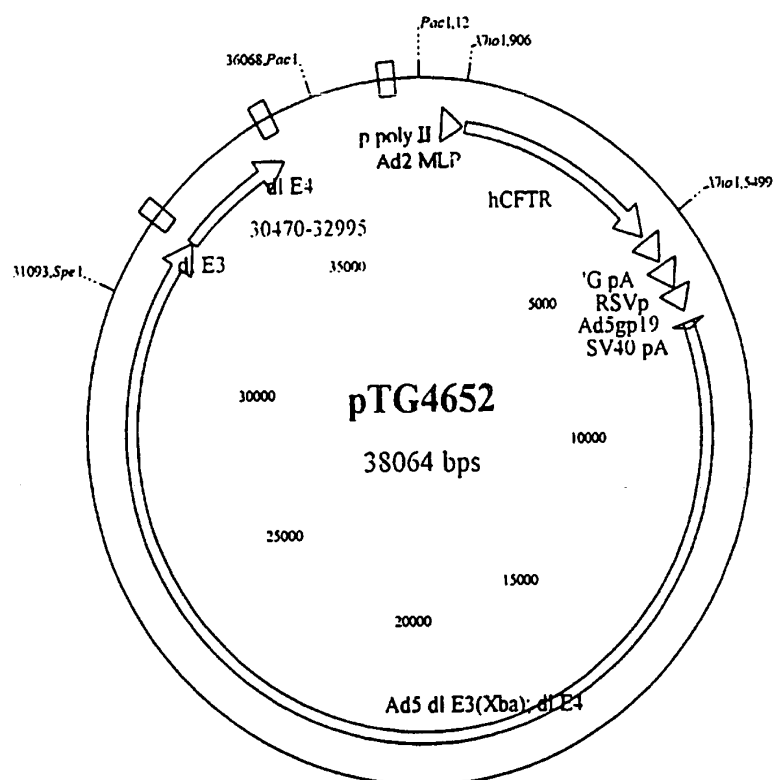


Figure 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 95/01590

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 C12N15/10 C12N7/00 C12N7/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| P,A | WO,A,95 03400 (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) 2 February 1995 see the whole document --- | 1 |
| A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, no. 13, 1994 WASHINGTON US, pages 6186-6190, KETNER, G. ET AL. 'Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an efficacious yeast artificial chromosome clone' see the whole document --- -/- | 1 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 1996

Date of mailing of the international search report

26. 03. 99

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 95/01590

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P,A | JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY., vol. 39, no. 2, 1995 AMSTERDAM NL, DEGRYSE, E. 'Evaluation of Escherichia coli recBC sbcBC mutants for cloning by recombination in vivo' see the whole document --- | 1 |
| A | VIRUS RESEARCH, vol. 28, no. 2, 1993 pages 153-170, SCHORR, J. & DOERFLER 'Non-homologous recombination between adenovirus and AcNPV DNA fragments in cell-free extracts from insect Spodoptera frugiperda nuclei' see the whole document --- | 1 |
| A | SCIENCE, vol. 196, no. 4286, 1977 LANCASTER, PA US, PERRICAUDET, M. ET AL. 'Excision and recombination of adenovirus DNA fragments in Escherichia coli' see the whole document --- | 1 |
| A | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, no. 4, 1993 pages 817-821, BOYD, A.C. 'Turbo cloning: a fast, efficient method for cloning PCR products and other blunt-ended DNA fragments into plasmids' see the whole document --- | 1 |
| P,A | YEAST, vol. 11, no. 7, 1995 pages 629-640, DEGRYSE, E. ET AL. 'In vivo cloning by homologous recombination in yeast using a two-plasmid-based system' see the whole document --- | 1 |
| A | JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 227, no. 1, 1992 pages 72-80, LUISI-DE LUCA, C. & KOLODNER, R.D. 'Effects of terminal non-homology on intramolecular recombination of linear plasmid substrates in Escherichia coli' see the whole document --- -/-- | 1 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01590

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 90, no. 15, September 1993 WASHINGTON US, pages 7356-7360, TATZELT, J. ET AL. 'Fractionated nuclear extracts from hamster cells catalyze cell-free recombination at selective sequences between adenovirus DNA and a hamster preinsertion site' see page 5 --- | 1 |
| P,A | GENE THERAPY, vol. 2, no. 4, June 1995 pages 263-268, IMLER, J.L. ET AL. 'An efficient procedure to select and recover recombinant adenovirus vectors' see the whole document --- | 1 |
| X | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, no. 15, 25 July 1993 OXFORD GB, pages 3601-3602, BUBECK, P. ET AL. 'Rapid cloning by homologous recombination in vivo' see the whole document --- | 1 |
| A | METHODS: A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 5, 1993 pages 161-175, SPENCER, F. ET AL. 'Targeted recombination-based cloning and manipulation of large DNA segments in yeast' see the whole document ----- | 1 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 95/01590

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although Claims 19 and 20 in full and 22, 23 in part are directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the product/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC./FR 95/01590

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9503400 | 02-02-95 | NONE | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 95/01590

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/86 C12N15/10 C12N7/00 C12N7/01 | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N | | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| P,A | WO,A,95 03400 (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) 2 Février 1995 voir le document en entier --- | 1 |
| A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, no. 13, 1994 WASHINGTON US, pages 6186-6190, KETNER, G. ET AL. 'Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an efficacious yeast artificial chromosome clone' voir le document en entier --- <div style="text-align: right;">-/--</div> | 1 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> | | |
| <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*A* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">21 Février 1996</div> | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">26.03.95</div> |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Chambonnet, F</div> |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der de Internationale No
PCT/FR 95/01590

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| P,A | JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY., vol. 39, no. 2, 1995 AMSTERDAM NL, DEGRYSE, E. 'Evaluation of Escherichia coli recBC sbcBC mutants for cloning by recombination in vivo' voir le document en entier --- | 1 |
| A | VIRUS RESEARCH, vol. 28, no. 2, 1993 pages 153-170, SCHORR, J. & DOERFLER 'Non-homologous recombination between adenovirus and AcNPV DNA fragments in cell-free extracts from insect Spodoptera frugiperda nuclei' voir le document en entier --- | 1 |
| A | SCIENCE, vol. 196, no. 4286, 1977 LANCASTER, PA US, PERRICAUDET, M. ET AL. 'Excision and recombination of adenovirus DNA fragments in Escherichia coli' voir le document en entier --- | 1 |
| A | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, no. 4, 1993 pages 817-821, BOYD, A.C. 'Turbo cloning: a fast, efficient method for cloning PCR products and other blunt-ended DNA fragments into plasmids' voir le document en entier --- | 1 |
| P,A | YEAST, vol. 11, no. 7, 1995 pages 629-640, DEGRYSE, E. ET AL. 'In vivo cloning by homologous recombination in yeast using a two-plasmid-based system' voir le document en entier --- | 1 |
| A | JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 227, no. 1, 1992 pages 72-80, LUISI-DE LUCA, C. & KOLODNER, R.D. 'Effects of terminal non-homology on intramolecular recombination of linear plasmid substrates in Escherichia coli' voir le document en entier --- | 1 |

-/--

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der de Internationale No
PCT/FR 95/01590

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 90, no. 15, Septembre 1993 WASHINGTON US, pages 7356-7360, TATZELT, J. ET AL. 'Fractionated nuclear extracts from hamster cells catalyze cell-free recombination at selective sequences between adenovirus DNA and a hamster preinsertion site' voir page 5 --- | 1 |
| P,A | GENE THERAPY, vol. 2, no. 4, Juin 1995 pages 263-268, IMLER, J.L. ET AL. 'An efficient procedure to select and recover recombinant adenovirus vectors' voir le document en entier --- | 1 |
| X | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, no. 15, 25 Juillet 1993 OXFORD GB, pages 3601-3602, BUBECK, P. ET AL. 'Rapid cloning by homologous recombination in vivo' voir le document en entier --- | 1 |
| A | METHODS: A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 5, 1993 pages 161-175, SPENCER, F. ET AL. 'Targeted recombination-based cloning and manipulation of large DNA segments in yeast' voir le document en entier ----- | 1 |

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR95/01590

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°^{es} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que les revendications 19 et 20 complètement et 22,23 partiellement concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition).
2. ☐ Les revendications n°^{es} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°^{es} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^{es}:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^{es}:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de Internationale No

PLR/FR 95/01590

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevets | Date de publication |
|---|------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| WO-A-9503400 | 02-02-95 | AUCUN | |